

おからからの有用オリゴ糖の生産

高橋 亨**、小浜 恵子*、岸 敦*、
米倉 裕一*、大澤 純也*

現在は産業廃棄物として取り扱われているおからの有効利用の観点から、おからヘミセルロースを原料としたオリゴ糖の生産を試みた。市販酵素であるマセロチームAをイオン交換クロマトグラフで分画することで、いくつかのオリゴ糖を生成する活性を有するフラクションを得た。また、ラットを用いておからヘミセルロースの生理機能を検索したところ、肝臓の総コレステロール濃度、中性脂肪濃度を低下させる傾向が見られた。

キーワード：おから、オリゴ糖、ヘミセルラーゼ

Preparation of Oligosaccharide from Okara(Tofu residue) Hemicellulose

TAKAHASHI Tohru, KOHAMA Keiko, KISHI Atsushi,
YONEKURA Yuichi, OHSAWA Junya

Okara is a huge industrial waste now. Useful production of oligosaccharide from hemicellulose of okara was studied. Macerozyme A, commercially available hemicellulase, was partially purified by ion exchange chromatograph. As a result, some oligosaccharides were obtained by applying the partially purified fraction to hemicellulose hydrolysis. When rats were fed a diet containing 5% hemicellulose, a tendency of decrease in the density of the total cholesterol and triglyceride in the liver was observed.

key words : oligosaccharide, hemicellulase, okara

1 緒 言

豆腐製造時の副産物として生ずるおからは、これまで食品や肥料、飼料として完全に消費されてきたが、現在ではその多くが費用をかけて廃棄処分されており、豆腐製造業者にとっておからの処理は深刻な問題の一つである。

我々は、おからの有効利用という観点から、おからに大量に含まれる食物繊維に着目し、おからからH-A（キシロースが主成分）、H-B（アラビノース、ガラクトースが主成分）の2種のヘミセルロースを分離し、酵素分解することによりオリゴ糖を得ることができたが、生成物はオリゴ糖より単糖の比率が高かった¹⁾。今回はオリゴ糖の生産効率の改善のため、ヘミセルラーゼの部分精製について検討した。また、H-Bの生理機能を検索し、機能性食物繊維としての食品素材への利用の可能

性を併せて検討したので報告する。

2 実験方法

2-1 ヘミセルラーゼの部分精製

2-1-1 ヘミセルラーゼ

マセロチームA（ヤクルト薬品工業株式会社製）を使用した。

2-1-2 ヘミセルラーゼの部分精製

マセロチームA 10gを10mM酢酸緩衝液(pH5.0)100mlに溶解し、0.2μmのフィルターでろ過した。これをFPLC（ファルマシア社）を用い、カラムMONO-Q HR 5/5に供給し、10mM酢酸緩衝液(pH5.0)、0.5M NaClグラディエント、流速1ml/minの条件で分取した。非吸

* 応用生物部

** 醸造技術部

着画分を限外ろ過によって濃縮し、MONO-S HR5/5、10mM 酢酸緩衝液 (pH4.0)、0.5MNaCl グラディエント、1ml/min の条件で1ml ずつ分取した。

2-1-3 ヘミセルラーゼの活性測定

ヘミセルラーゼ活性はヘミセルロースが分解して生ずる還元糖量で判定した。フラクション0.1ml、基質としておからから抽出した2種の5%ヘミセルロース (10mM 酢酸緩衝液、pH5.0に溶解)を0.9ml 加え、40℃、24時間、120rpm で振とうして反応した。100℃、10分間加熱して反応を停止後、650×g、10分間遠心分離し、その上澄みを Somogyi-Nelson 法で測定した。

2-1-4 高速液体クロマトグラフによる糖質の分析

オリゴ糖は、糖分析専用高速液体クロマトグラフ (ダイオネクス社 Bio-LC System) を用い、CarboPAC PA1 カラム (φ 18mm、L30cm)、200mMNaOH、0.5MCH₃COONa グラディエント、流速 1ml/min の条件で分析した。

2-2 H-Bの生理機能試験

H-Bの生理機能試験は、岩手大学農学部に委託して行った。

2-2-1 ラット飼育試験

ラットの飼育実験には4週齢のウィスター系ラットを用い、AIN-76 飼料²⁾に準じた表1のような組成の飼料を6頭ずつ23日間投与、2日間おきに飼料摂取量と体重を測定した。

2-2-2 Caの吸収率

飼育開始14~16日及び21~23日の2日間に糞尿を採取、Ca含量を測定した。これらのCaの量と飼料のCa含量と摂取量からのCa出納を計算して、2回のCaの見かけの吸収率を算出した。

2-2-3 血漿中のコレステロール濃度、中性脂肪濃度測定

Ca吸収率の実験終了後、18時間絶食させ、エーテル麻酔下で腹大静脈より採血し血漿を分離した。血漿中の総コレステロール濃度 (TC) は、血漿20μlをWAKO製キット、コレステロールC-テストワコーを用いて測定した。また、高密度リポ蛋白質濃度 (HDL) は、血漿50μlをWAKO製キット、HDL-コレステロール-テストワコーで測定し、低密度リポ蛋白質濃度 (LD

表1 飼料組成

	対照区	試験区
炭酸カルシウム	7.50	7.50
SPI	200.00	200.00
コーンスターチ	133.50	81.63
蔗糖	500.00	500.00
コーンオイル	50.00	50.00
塩混合	35.00	35.00
ビタミン混合	10.00	10.00
K ₂ HPO ₄	9.00	9.00
セルロース	50.00	50.00
コリン重酒石酸塩	2.00	2.00
D, L-メチオニン	3.00	3.00
H-B	-	51.87

(g/kg)

L) はTCとHDLの差から求めた。

中性脂肪濃度 (TG) は、血漿20μlをWAKO製キット、トリグリセライドG-テストワコーを用いて測定した。

2-2-4 肝臓中のコレステロール濃度、中性脂肪濃度測定

TCは、肝臓0.5gをFolchの方法³⁾で脂質を抽出し、その0.5mlを血漿中の総コレステロール濃度と同様にWAKO製キットを用いて測定した。

TGは、肝臓0.5gをFolchの方法で脂質を抽出し、その0.5mlをWAKO製キット、トリグリセライド-テストワコーを用いて測定した。

3 実験結果

3-1 ヘミセルラーゼの部分精製

マセロチームAをMONO-Qカラムで分画したところ、ヘミセルラーゼ活性は非吸着画分に存在した。これを濃縮しMONO-Sカラムで分画し、ヘミセルラーゼ活性を調べた (図1)。H-A、H-Bでは分解活性の強さのパターンが異なることがわかった。

3-2 生成オリゴ糖の分析

今回のヘミセルラーゼの部分精製では活性の強さだけではなく、分解物にオリゴ糖がどれくらい含まれるかが重要である。そこで、酵素の各フラクションとH-A、H-Bを反応し、分解物を糖分析用高速液体クロマトグ

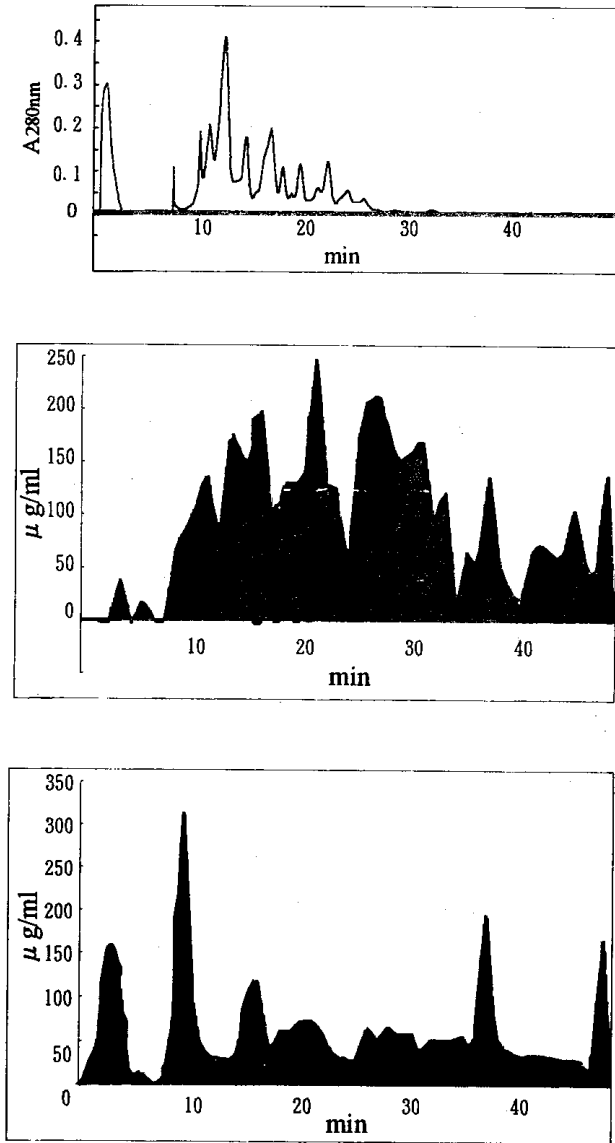


図1 マセロチームAのMONO-S(陽イオン交換)クロマトグラフィーとヘミセルラーゼ活性

上段: マセロチームAのMONO-Sクロマトグラフィー

中段: H-A分解活性

X軸 上段の時間と対応するフラクション

Y軸 酵素反応により生成した還元糖量(μg/ml)

下段: H-B分解活性

X軸 上段の時間と対応するフラクション

Y軸 酵素反応により生成した還元糖量(μg/ml)

ラフで分析した結果、いくつかのフラクションで高分子のオリゴ糖の生成が確認された。その中で、オリゴ糖の含量が高いのはH-Aでは溶出時間22分のフラクション(図2)、H-Bでは溶出時間3分のフラクションであった(図3)。

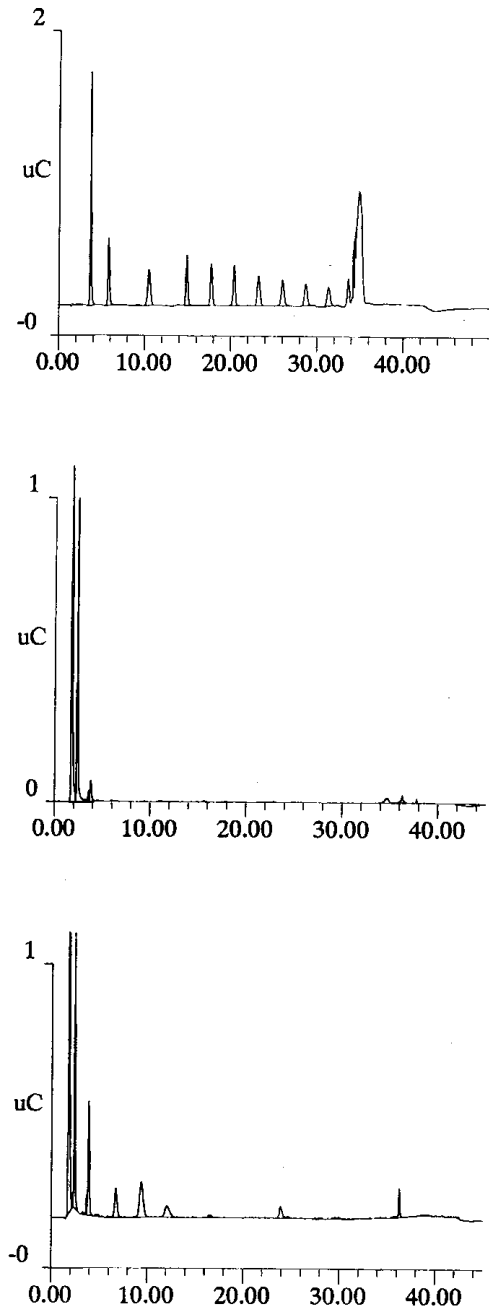


図2 分画前のマセロチームAと粗分画したマセロチームAのH-A反応分解物のクロマトグラフィーの比較

上段: グルコースの重合物のクロマトグラフィー

左のピークからn=1,2,3,4...と重合した糖が溶出する。

中段: 分画前のマセロチームAとH-Aを反応し、生じた分解物のクロマトグラフィー

下段: 溶出時間22分のフラクションとH-Aを反応し、生じた分解物のクロマトグラフィー

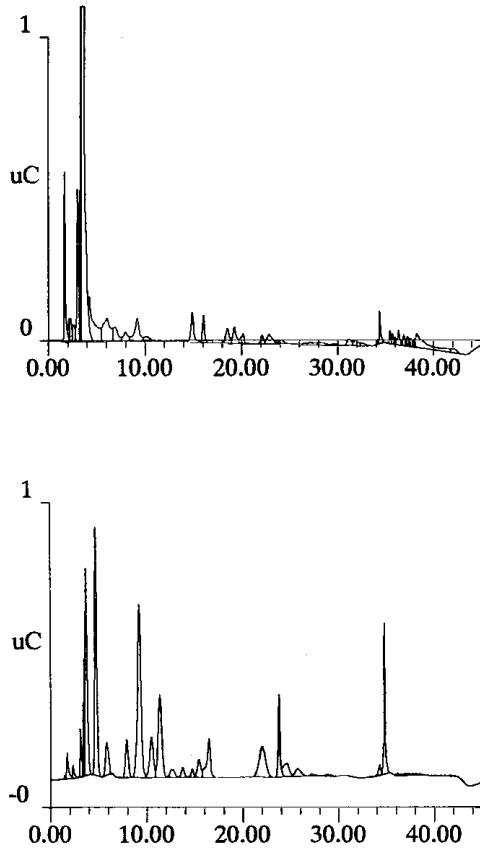


図3 分画前のマセロチームAと粗分画したマセロチームAのH-B反応分解物のクロマトグラフィーの比較
 上段：分画前のマセロチームAとH-Bを反応し、生じた分解物のクロマトグラフィー
 下段：溶出時間3分のフラクションとH-Bを反応し、生じた分解物のクロマトグラフィー

3-3 H-Bの生理機能

ラットを用いたH-Bの生理機能試験は、表2の通りであった。

表2 H-Bの生理機能試験

		対照区	試験区
飼料摂取量(g)		361.3±24.7	359.8±15.3
体重増加量(g)		154.8±9.5	155.6±5.9
Ca吸収率(%)		84.6±3.8	86.7±6.2
血漿中 (mg/dl)	TC	75.6±6.7	72.9±8.0
	HDL	52.9±8.5	37.3±3.0
	LDL	22.6±3.9	35.6±6.7
	TG	71.5±24.5	70.0±38.9
肝臓 (mg/g)	TC	70.2±15.2	44.4±24.9
	TG	181.1±31.2	132.6±25.6*

(平均+S D, n = 6) *有意差あり (p<0.05)

試料摂取量、体重増加量、Ca吸収率において両者に差は認められなかった。血漿中のTC、TGに差はなかった。試験区のHDLの減少、LDLの増加傾向が見られたが、これも有意な差ではなかった。一方、肝臓ではTGが試験区の方で有意に下がっており、また、有意な差ではないものの試験区のTCは顕著に低い値であった。

4 考 察

酵素の部分精製では、最初、マセロチームAをMONO-Qカラムで粗分画した。今回行った条件下では、マセロチームAのヘミセルラーゼ活性のほとんどが非吸着画分に含まれた。これは、不必要なタンパク質を短時間で除くのに有効であった。

MONO-Sカラムで分画した際、H-A、H-Bで分解活性のパターンが異なるのは、酵素の基質特異性によるものである。基質特異性の異なる複数のヘミセルラーゼを有するマセロチームAを、そのまま使用してオリゴ糖を生産するのはかなり困難であることが今回の結果で再確認された。

2種類のカラムで分画することで、比較的高分子量のオリゴ糖を生産するフラクションがいくつか得られたが、もっとも生産効率の良いのはH-Aの場合、22分のフラクションの部分であった。分解物をHPLCで分析した結果、キシロビオース、キシロトリオースと思われるピークが検出され、更にそれ以上の重合度のオリゴ糖も検出された。H-Bでは、3分のフラクションと反応させたとき、オリゴ糖が多く見られた。H-A、H-Bとも分解物の中に単糖の生成が見られるため、反応条件や反応産物の分離などを検討する必要がある。

H-Bの生理機能については、飼料摂取量、体重増加量、Ca吸収率、血漿中の脂質代謝に有意な差は見られなかった。食物繊維の中には、コレステロール降下作用を有するものがいくつか知られている。今回の試験では、血漿中のTC、HDL、LDLは試験区と対象区での有意差は見られなかった。一方、肝臓のTGは有意に低下し、また、TCでは有意差はないものの顕著に低下している。この結果より、H-Bを摂取することにより肝臓中の脂質合成等に何らかの影響を与えると判断される。しかし、対照区、試験区ともTG、TCの濃度は正常値の範囲内であり、H-Bに明らかなコレステロール降下作用があるとは言いきれない。H-Bにコレステロール降下作用があるかどうかは、ラットが高コレステロールを引き起こす条件下での動物実験を行う必要がある。

コレステロール降下作用を含め、H-Bの生理機能については現在も調査中であり、何らかの生理機能が見つ

かることを期待している。

5 結 語

市販細胞壁溶解酵素であるマセロチームAを粗分画し、H-A、H-Bを分解したところ、以前に比べオリゴ糖の生産効率が上昇した。更に効率を上げるために、単糖を除く処理や反応条件の検討をする必要がある。

また、H-Bをラットに摂食させた結果、飼料摂取量、体重増加量、Ca吸収率に影響を与えずに肝臓のコレステロールや中性脂肪量を低下させる傾向があった。コレステロール降下作用については、更に詳細に検討する必要がある。また、他の機能性についても検索しなければならない。

おからヘミセルロース、あるいは酵素分解により生産したオリゴ糖が何らかの機能性を有することで食品素材

としての利用が見いだせれば、おからの有効利用の一手段になると考えられる。

本研究を実施するに当たり、H-Bの生理機能試験、ならびに御指導、御助言していただきました岩手大学農学部西澤直行教授に感謝いたします。また実験にご協力いただきました大谷民子さんに深く感謝いたします。

文 献

- 1) 山本忠、高橋亨、大谷民子：岩手工技セ研報，1，67 (1995)
- 2) American Institute of Nutrition, *J.Nutr.*, **107**, 1340 (1977)
- 3) J. Folch et al., *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)